

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## BEST AVAILABLE IMAGES

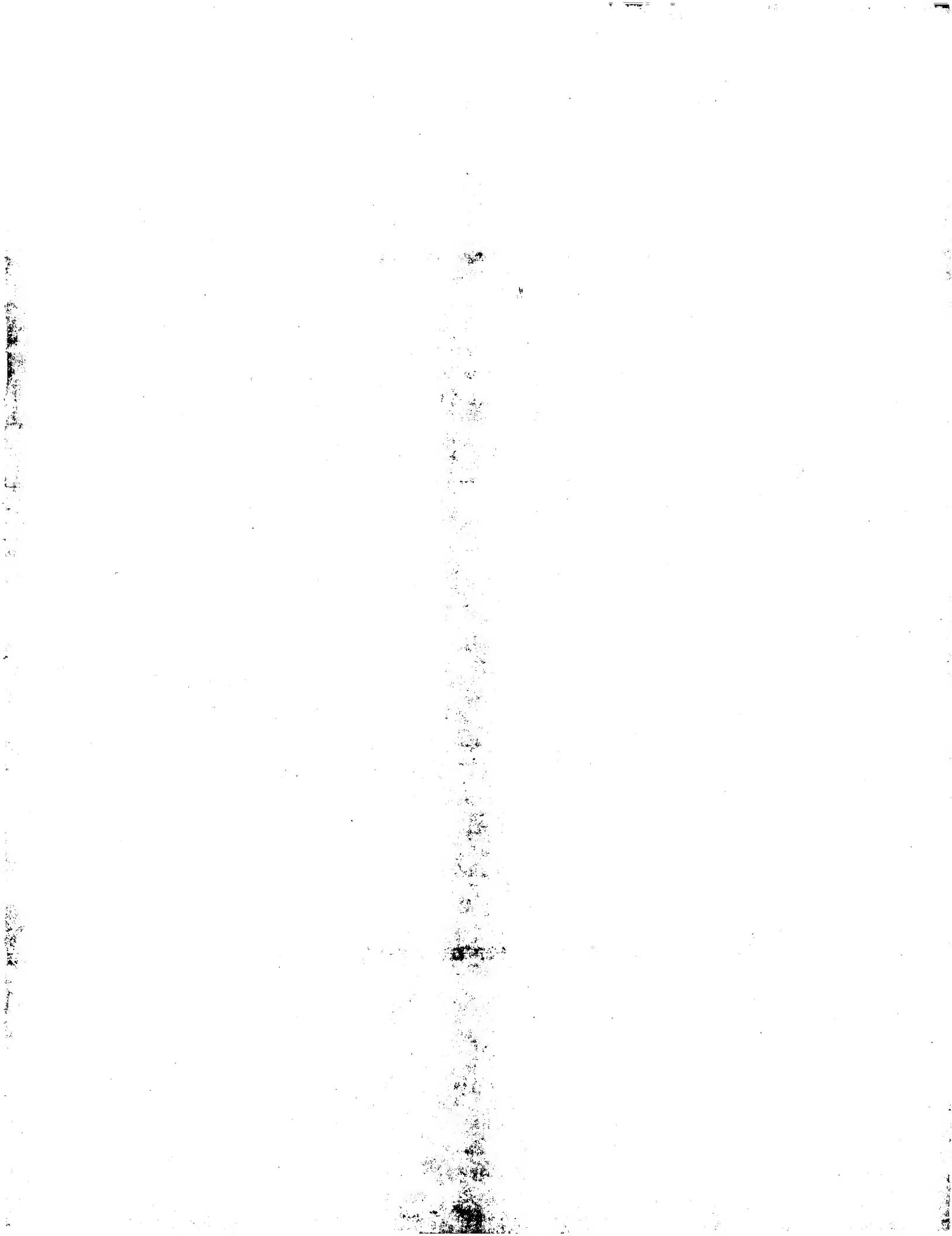
Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

## IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.



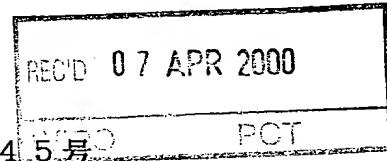
09/890646  
PCT/JP00/00596

日本特許庁 04.02.00  
PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日  
Date of Application: 1999年 2月 4日



出願番号  
Application Number: 平成11年特許願第0637415号

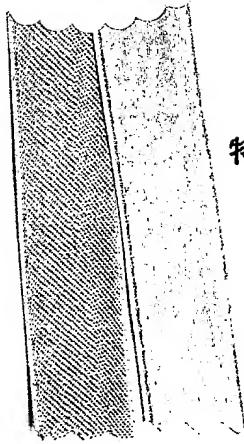
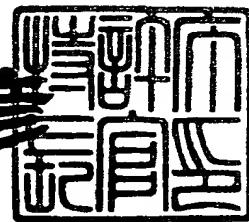
出願人  
Applicant(s): 学校法人日本大学

PRIORITY  
DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 3月24日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

近藤 隆彦



出証番号 出証特2000-3014059

【書類名】 特許願  
【整理番号】 PA99001  
【あて先】 特許庁長官殿  
【国際特許分類】 C12N 15/00  
【発明者】  
【住所又は居所】 神奈川県藤沢市亀井野1866 日本大学内  
【氏名】 綾部 真一  
【発明者】  
【住所又は居所】 神奈川県藤沢市亀井野1866 日本大学内  
【氏名】 青木 俊夫  
【発明者】  
【住所又は居所】 神奈川県藤沢市亀井野1866 日本大学内  
【氏名】 明石 智義  
【特許出願人】  
【住所又は居所】 東京都千代田区九段南四丁目8番24号  
【氏名又は名称】 学校法人日本大学  
【代理人】  
【識別番号】 100101591  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 川俣 静子  
【手数料の表示】  
【予納台帳番号】 049342  
【納付金額】 21,000円  
【提出物件の目録】  
【物件名】 明細書 1  
【物件名】 図面 1  
【物件名】 要約書 1  
【物件名】 微生物の受託証の写し 1

【書類名】 明細書

【発明の名称】 2-ヒドロキシイソフラバノンシンターゼをコードするポリヌクレオチド

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 配列番号：2で表されるアミノ酸配列を実質的に含むアミノ酸配列を有する2-ヒドロキシイソフラバノンシンターゼ。

【請求項 2】 請求項1記載の2-ヒドロキシイソフラバノンシンターゼをコードするヌクレオチド配列または該ヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を実質的に含むポリヌクレオチド。

【請求項 3】 配列番号：1に含まれるヌクレオチド配列に対して50%以上の相同性を有し、且つ2-ヒドロキシイソフラバノンシンターゼをコードするヌクレオチド配列または該ヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を実質的に含むポリヌクレオチド。

【請求項 4】 配列番号：1のコード領域のヌクレオチド配列の少なくとも一部にストリンジエントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチド。

【請求項 5】 配列番号：1のコード領域のヌクレオチド配列の少なくとも一部に温和な条件でハイブリダイズするポリヌクレオチド。

【請求項 6】 配列番号：1に含まれるヌクレオチド配列に対して50%以上の相同性を有し、2-ヒドロキシイソフラバノンシンターゼをコードするヌクレオチド配列または該ヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を実質的に含むポリヌクレオチドのプローブまたはプライマーとして機能し得るヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド。

【請求項 7】 配列番号：1に含まれるヌクレオチド配列の少なくとも15個の連續したヌクレオチド配列に対して70%以上の相同性を有し、2-ヒドロキシイソフラバノンシンターゼをコードするヌクレオチド配列または該ヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を実質的に含むポリヌクレオチドのプローブまたはプライマーとして機能し得るヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド。

【請求項 8】 宿主細胞中で、請求項1の2-ヒドロキシイソフラバノンシ

ンターゼをコードするヌクレオチド配列または該ヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を実質的に含むポリヌクレオチドを発現し得る発現系を含む組み換え体DNAまたはRNA。

【請求項9】 請求項8の組み換え体DNAまたはRNAを含む宿主細胞。

【請求項10】 請求項9の宿主細胞を培養することを含む請求項1記載の2-ヒドロキシイソフラバノンシンターゼの製造方法。

【請求項11】 さらに、生産された2-ヒドロキシイソフラバノンシンターゼを回収することを含む請求項10記載の方法。

【請求項12】 請求項8の組み換え体DNAまたはRNAを植物細胞に導入することにより、2-ヒドロキシイソフラバノンシンターゼ、2-ヒドロキシイソフラバノンシンターゼが触媒する酵素反応の生成物またはその誘導体を生産するように形質転換されたトランスジェニック植物。

【請求項13】 請求項8の組み換え体DNAまたはRNAを植物細胞に導入することにより、2-ヒドロキシイソフラバノンシンターゼ、2-ヒドロキシイソフラバノンシンターゼが触媒する酵素反応の生成物またはその誘導体の生産量を変化させたトランスジェニック植物。

#### 【発明の詳細な説明】

##### 【0001】

##### 【発明が属する技術分野】

本発明は、新たに同定された2-ヒドロキシイソフラバノンシンターゼ及びこれをコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドにより形質転換された形質転換体に関する。

##### 【0002】

##### 【従来の技術】

イソフラボン類は、イソフラボン骨格を有する化合物であり、特にマメ科植物に多く含まれる。植物において、イソフラボン類はファイトアレキシンとして作用することが知られている。ファイトアレキシンとは、微生物の感染等のストレスに対して、植物が産生する抗菌性物質である。

また、イソフラボン類、特にダイゼインやゲニステインは、エストロジエン様

の作用を有する生理活性物質であり、乳ガンや骨粗鬆症の予防の機能を有するとして注目されている。

また、6, 7, 4'-トリヒドロキシイソフラボン、7, 8, 4'-トリヒドロキシイソフラボン等、強力な抗酸化物質として注目されている物質もある。

一方、イソフラボン類に富むマメ科植物を家畜の飼料として用いていたところ、家畜の不妊化という問題が生じたという実例もある。

従って、イソフラボン類の生産や、植物の食品としての機能を高める、植物の耐病性を高める、家畜の飼料として適当な植物を供給する等を目的とした植物におけるイソフラボン類の生産量の制御の可能性が注目を集めている。

#### 【0003】

ところで、イソフラボンの骨格は、図1に示すように、フラバノン類から2-ヒドロキシイソフラバノン類への酸化的アリール転位反応を経て生合成され、その反応を触媒する酵素、即ち2-ヒドロキシイソフラバノンシンターゼの存在が知られている。従って、2-ヒドロキシイソフラバノンシンターゼは、イソフラボン類の合成において非常に重要な酵素である。

#### 【0004】

##### 【発明が解決しようとする課題】

上記のような有用な活性を有するイソフラボン類の生産や、植物におけるそれらの生産量の制御のためには、2-ヒドロキシイソフラバノンシンターゼの単離・精製や、そのアミノ酸配列及びそれをコードするDNA配列の解明が重要であるにもかかわらず、これまでのところ、その単離・精製も、アミノ酸配列・cDNA配列の解明も実現されていなかった。

#### 【0005】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明者らは、2-ヒドロキシイソフラバノンシンターゼのcDNAの単離とDNA及びアミノ酸配列の決定をなすべく、植物材料、培養条件、mRNA誘導等を、銳意研究した結果、カンゾウ (*Glycyrrhiza echinata*) のカルス培養物を、酵母抽出物によりエリシター処理した後、6~12時間経過した細胞から作製したcDNAライブラリーから、2-ヒドロキシイソフラ

バノンシンターゼをコードするcDNAをクローニングすることに成功した。

【0006】

従って、本発明は、配列番号：2で表されるアミノ酸配列を実質的に含むアミノ酸配列を有する2-ヒドロキシイソフラバノンシンターゼに関する。

【0007】

さらに、本発明は、上記の2-ヒドロキシイソフラバノンシンターゼをコードするヌクレオチド配列または該ヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を実質的に含むポリヌクレオチドに関する。

【0008】

別の観点において、本発明は、配列番号：1に含まれるヌクレオチド配列に対して50%以上、好ましくは70%、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上、特に95%以上の相同性を有し、且つ2-ヒドロキシイソフラバノンシンターゼをコードするヌクレオチド配列または該ヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を実質的に含むポリヌクレオチドに関する。

【0009】

さらに別の観点において、本発明は、配列番号：1のコード領域のヌクレオチド配列にストリンジェントな条件または温和な条件でハイブリダイズするポリヌクレオチドに関する。

なお、温和なハイブリダイゼーションの条件及びストリンジェントなハイブリダイゼーションの条件は、例えば、Sambrook等、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd. Vol. 1, pp. 101-104, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989)に記載されている。

【0010】

さらに、本発明は、カンゾウ、好ましくはGlycyrrhiza echinataの細胞をエリシター処理し、1~12時間好ましくは、1~8時間、特に3~6時間後の細胞から作製したcDNAライブラリーから、請求項6または7記載のポリヌクレオチドをプローブとしてクローニングして得られる、2-ヒドロキシイソフラバノンシンターゼをコードするポリヌクレオチドにも関する。

エリシター処理は、好ましくは酵母抽出物により行われる。

#### 【0011】

また、本発明は、配列番号：1に含まれるヌクレオチド配列に対して50%以上、好ましくは70%、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上、特に95%以上の相同性を有し、2-ヒドロキシイソフラバノンシンターゼをコードするポリヌクレオチドのプローブまたはプライマーとして機能し得るヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、特に配列番号：1に含まれるヌクレオチド配列の少なくとも15個の連続したヌクレオチド配列に対して70%以上、好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上、特に95%以上の相同性を有するかかるプローブまたはプライマーとしての機能を有するポリヌクレオチドに関する。

#### 【0012】

また、宿主細胞中で、2-ヒドロキシイソフラバノンシンターゼをコードするヌクレオチド配列または該ヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を実質的に含むポリヌクレオチドを発現し得る発現系を含む組み換え体DNAまたはRNA、該組み換え体DNAまたはRNAを含む宿主細胞、並びに該宿主細胞を培養することを含む2-ヒドロキシイソフラバノンシンターゼの製造方法にも関する。該製造方法は、さらに、生産されたポリペプチドを回収することを含んでいてもよい。

さらに、本発明は、上記本発明の組み換え体DNAまたはRNAを植物細胞に導入することにより、2-ヒドロキシイソフラバノンシンターゼ、2-ヒドロキシイソフラバノンシンターゼが触媒する酵素反応の生成物またはその誘導体を生産するように、またはその量を変化させるように形質転換したトランスジェニック植物にも関する。

また、本発明のポリペプチドのモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体は、当該分野においてよく知られた方法により製造することができ、本発明はかかる抗体をも含む。

#### 【0013】

#### 【発明の実施の形態】

## 1. 定義

本明細書の理解を容易にするために、用語の定義を下記に示す。

本明細書において、「2-ヒドロキシイソフラバノンシンターゼ（以下、IFSと記す）」は、シトクロムP450の機能解析において通常使用される方法を用いると、フラバノン類を基質として、水酸化反応とアリール転位反応により2-ヒドロキシイソフラバノン類を合成する酵素活性を有するポリペプチドを意味する。

即ち、例えば、酵母等の真核細胞で発現させたときに、そのミクロソームが、NADPH補酵素等の存在下、好気的条件下で、かかる反応を触媒する活性を有するポリペプチドであること、またはP450還元酵素及びジラウリルホスファチジルコリン等のリン脂質と混合して電子伝達系を再構成すれば同条件下でかかる反応を触媒する活性を有するポリペプチドであることを意味する。

### 【0014】

本発明のIFSは、配列番号：2で表されるアミノ酸配列を実質的に含むアミノ酸配列を有する。

「配列番号：2で表されるアミノ酸配列を実質的に含む」とは、当該アミノ酸配列に、欠失、置換、付加、挿入等の変異があるものを含むことを意味する。即ち、本発明のIFSは、上記酵素活性が保たれる限り、そのような変異を有するものをも含む。欠失、置換、付加、挿入されるアミノ酸の数は、例えば1～20個、好ましくは1～10個、特に1～5個であり得る。例えば、アミノ酸残基を同様の特性の別のアミノ酸残基で置換したものであり得る。典型的なかかる置換は、Ala、Val、LeuおよびIle間、SerおよびThr間、酸性残基AspおよびGlu間、AsnおよびGln間、塩基性残基LysおよびArg間、または芳香族残基Pheおよび Tyr間の置換である。

さらに、本発明は、請求項1記載のIFSの抗原活性を有するポリペプチドをも含む。

本発明のIFSは、天然に存在するポリペプチドを単離したもの、遺伝子組換え技術により製造されたもの、または当該分野で知られた技術により合成されたもののいずれでもよい。

また、本発明のIFSには、*Glycyrrhiza echinata*由來のものの他、*Glycyrrhiza*属の他の種由來のポリペプチド、マメ科植物の他の属の植物由來のポリペプチド、または他の科の植物由來のポリペプチドも含まれる。

#### 【0015】

本明細書において「本発明のポリヌクレオチド」は、上記で説明した、請求項2～7に記載されたポリヌクレオチドを意味する。

#### 【0016】

本発明のIFSをコードするポリヌクレオチドを含むプラスミドを保有する*Escherichia coli* K12株の形質転換体CYP Ge-8は、平成11年2月1日より、通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（郵便番号305茨城県つくば市東一丁目1番3号）に寄託されており、受託番号FERM P-17189が付与されている。本発明は、受託番号FERM P-17189の*Escherichia coli* K12株から常法により得られ、IFSをコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドにも関する。

#### 【0017】

「ポリヌクレオチド」とは、ポリリボヌクレオチドまたはポリデオキシリボヌクレオチドをいい、未修飾RNAもしくはDNA、または修飾RNAもしくはDNAであり得る。

本発明において、「ポリヌクレオチド」は、天然に存在する状態から単離されたものであり得る。また、本明細書において、「ポリヌクレオチド」の語は、1本鎖DNA、2本鎖DNA、1本鎖および2本鎖領域の混在するDNA、1本鎖RNA、2本鎖RNA、および1本鎖および2本鎖領域の混在するRNA、1本鎖、2本鎖または1本鎖および2本鎖領域の混在するDNAおよびRNAを含むハイブリッド分子を含む。

また、「ポリヌクレオチド」の語は、1個またはそれ以上の修飾塩基を含むDNAまたはRNA、および安定性または他の理由のために修飾された骨格を有するDNAまたはRNAを含む。

「修飾塩基」の語は、例えばトリチル化された塩基およびイノシンのような塩

基を含む。従って、「ポリヌクレオチド」は、化学的、酵素的、あるいは代謝的に修飾された形態のポリヌクレオチドであり得る。

また、本明細書において、「ポリヌクレオチド」の語は、オリゴヌクレオチドをも含むものとする。

#### 【0018】

「ポリペプチド」は、ペプチド結合または修飾されたペプチド結合により互いに結合した2個またはそれ以上のアミノ酸を含んでなるペプチドまたはタンパク質をいう。「ポリペプチド」は、短鎖（いわゆるペプチド、オリゴペプチドまたはオリゴマー）および長鎖（タンパク質）の両方をいう。

「ポリペプチド」は、翻訳後修飾プロセッシングのごとき天然プロセスによつてか、または当該分野でよく知られた化学的修飾法によって修飾されたアミノ酸配列を包含する。かかる修飾は、当該技術分野においてよく知られている。ペプチド骨格、アミノ酸側鎖およびアミノ末端およびカルボギシル末端を包含するポリペプチドのいずれの場所においても修飾が起こり得る。ポリペプチドは多くのタイプの修飾を含みうる。ユビキチネーションの結果としてポリペプチドは分岐されていてもよく、また、分岐を有してまたは有さずに環化されていてもよい。修飾には、アセチル化、アシリル化、ADP-リボシル化、アミド化、フラビンの共有結合、ヘム部分の共有結合、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質または脂質誘導体の共有結合、ホスホジルイノシトールの共有結合、架橋、環化、ジスルフィド結合の形成、脱メチル化、共有結合による架橋の形成、シスチンの形成、ピログルタミン酸の形成、ホルミル化、ガンマカルボギシル化、グリコシレーション、GPIアンカー形成、ヒドロキシル化、ヨウ素化、メチル化、ミリストイル化、酸化、蛋白分解的プロセッシング、ホスホリレーション、ブレニレル化、ラセミ化、セレノイル化、硫酸化、アルギニン化のごときトランスファー-RNAにより媒介される蛋白へのアミノ酸付加、およびユビキチネーションがある。

#### 【0019】

「アンチセンス阻害」は、標的の一次転写産物またはmRNAの全てまたは一部に相補的で、その一次転写産物またはmRNAのプロセッシング、移動、及び

／または翻訳を妨げるアンチセンスRNAにより、標的遺伝子の発現を阻止することをいう。アンチセンスRNAの相補性は、特定の遺伝子転写産物のいかなる部分、すなわち、5' ノンコーディング配列、3' ノンコーディング配列、イントロン、またはコーディング配列、とでもよい。加えて、本明細書に用いられるアンチセンスRNAは、アンチセンスRNAの遺伝子発現を妨げる効力を増すリボザイム配列の領域を含むことができる。

「リボザイム」は、触媒RNAをいい、配列特異的なエンドリボヌクレアーゼを含む。本明細書に用いられる「適当な調節配列」は、本発明の核酸フラグメントの上流(5')、内部、及び／または下流(3')に位置し、本発明の核酸フラグメントの発現を制御する、天然またはキメラの遺伝子内のヌクレオチド配列をいう。

「エンハンサー」は、プロモーター活性を高めることのできるDNA配列である。エンハンサーは、プロモーターの本来の要素、あるいは、プロモーターのレベル及び／または組織特異性を高めるために挿入した異種要素であってもよい。

「3' ノンコーディング配列」は、ポリアデニレーションシグナル、及びmRNAのプロセッシングまたは遺伝子発現に影響を及ぼすことのできる他のあらゆる調節シグナルを含む、遺伝子のDNA配列部分をいう。ポリアデニレーションシグナルは、通常、mRNA前駆体の3' 末端へのポリアデニル酸部分の付加に影響を及ぼすことを特徴とする。

「植物」は、真核生物及び原核生物の両方の光合成生物をいう。

本明細書において、種々の表現方法により、本発明のポリヌクレオチドを説明したが、本発明のポリヌクレオチドには、本発明において明らかとなったcDNA配列の情報に基づき、当業者が当該分野で知られている方法により得ることができ且つIFS活性を確認することのできる全てのヌクレオチド配列と、該情報に基づき、IFSを得るために使用されるプローブまたはプライマーとして利用される得る全てのヌクレオチド配列が含まれ、本発明はこれらの全てを包含する意図である。

## 【0020】

### 2. 形質転換体の作製及びIFSの生産

本発明の形質転換体は、本発明の組み換え体DNAまたはRNAを、該組み換え体DNAまたはRNAを作製する際に用いた発現ベクターに適合する宿主中に導入することにより得られる。精製された遺伝子を、適当なベクターの制限酵素部位又はマルチクローニングサイトに挿入して組換え体DNAまたはRNAを作製し、当該組換え体DNAまたはRNAを用いて、宿主細胞を形質転換する。

DNA断片を挿入するためのベクターDNAは、宿主細胞中で複製可能なものであれば特に限定されず、例えば、プラスミドDNA、ファージDNA等が挙げられる。プラスミドDNAとしては、例えばプラスミドpUC118（宝酒造社製）、pUC119（宝酒造社製）、pBluescript SK (+) (Stratagene社製)、pGEM-T (Promega社製) 等が挙げられ、ファージDNAとしては、例えばM13mp18、M13mp19等が挙げられる。

宿主としては、目的とする遺伝子を発現できるものであれば特に限定されず、真核細胞及び原核細胞のいずれをも用いることができるが、好ましくは真核細胞を用いる。例えば、大腸菌 (*Escherichia coli*)、バチルス・ズブチリス (*Bacillus subtilis*) 等の細菌、サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 等の酵母、昆虫細胞、COS細胞、CHO細胞等の動物細胞などが挙げられる。

#### 【0021】

大腸菌等の細菌を宿主として用いる場合は、本発明の組換え体DNAまたはRNAが該宿主中で自立複製可能であり、プロモーター、本発明のポリヌクレオチド、転写終結配列を含む構成であることが好ましい。例えば、大腸菌としてはXL1-Blue (Stratagene社製)、JM109 (宝酒造社製) 等が挙げられ、発現ベクターとしては、例えば pBTrp2等が挙げられる。プロモーターとしては、大腸菌等の宿主中で発現できるものであればいずれを用いてもよい。例えば、trp プロモーター、lac プロモーター、PL プロモーター、PR プロモーターなどの大腸菌やファージ等に由来するプロモーターが用いられる。形質転換は、例えばHanahanの方法 [Techniques for Transformation of *E. coli* In DNA C

loning, vol. 1, Glover, D. M. (ed.) pp109-136, IRL Press (1985) ]により行うことができる。

【0022】

酵母を宿主として用いる場合は、発現ベクターとして、例えばYEp13、YCp50等が挙げられる。プロモーターとしては、例えばgal 1プロモーター、gal 10プロモーター等が挙げられる。酵母への組換え体DNAまたはRNAの導入方法としては、例えばエレクトロポレーション法 (Methods Enzymol., 194, 182-187 (1990))、スフェロプラスト法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 1929-1933 (1978))、酢酸リチウム法 (J. Bacteriol., 153, 163-168 (1983)) 等が挙げられる。

【0023】

動物細胞を宿主として用いる場合は、発現ベクターとして例えばpcDNAI、pcDNAI/Amp (インビトロジェン社) 等が用いられる。動物細胞への組換え体DNAまたはRNAの導入方法としては、例えば、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法等が挙げられる。

ベクターDNAとしてプラスミドDNAを用いる場合、例えばEcoRI DNA断片を挿入する際、プラスミドDNAを制限酵素EcoRI (NEB 社製) を用いて消化しておく。次いで、DNA断片と切断されたベクターDNAとを混合し、これに、例えばT4 DNAリガーゼ (宝酒造社製) を作用させて組換え体DNAを得る。

【0024】

上記形質転換株のスクリーニングは、目的遺伝子の一部を含むDNA断片をプローブとしたコロニーハイブリダイゼーション、あるいは、目的の遺伝子の塩基配列に基づいた5'プライマーを合成し、次いで、相補鎖DNAの塩基配列に基づいた3'プライマーを合成し、これらのプライマーを用いたPCR法により、目的とする遺伝子を含むコロニーを選択することができる。

【0025】

前記のようにして得られた組換え体DNAまたはRNAを保有する形質転換体

を培養すれば、本発明のポリペプチドを生産することができる。培養方法は、通常の固体培養法でもよいが、液体培養法を採用することが好ましい。

形質転換体を培養する培地としては、例えば酵母エキス、ペプトン、肉エキス等から選ばれる1種以上の窒素源に、リン酸水素二カリウム、硫酸マグネシウム、塩化第二鉄等の無機塩類の1種以上を添加し、更に必要により糖質原料、抗生物質、ビタミン等を適宜添加したものが用いられる。また、必要により培地にIPTG等を添加して、遺伝子の発現を誘導してもよい。培養開始時の培地のpHは7.2~7.4に調節し、培養は通常36~38℃、好ましくは37℃前後で14~20時間、通気搅拌培養、振盪培養等により行う。

#### 【0026】

培養終了後、培養物より本発明のIFSを採取するには、通常のタンパク質精製手段を用いることができる。すなわち、リゾチーム等の酵素を用いた溶菌処理、超音波破碎処理、磨碎処理等により、界面活性剤の存在下で、菌体を破壊し、IFSを可溶化させた後、菌体外に排出させる。次いで、濾過又は遠心分離等を用いて不溶物を除去し、粗ポリペプチド溶液を得る。

上記粗ポリペプチド溶液から、IFSをさらに精製するには、界面活性剤を適宜用いながら、通常のタンパク質精製法を使用することができる。例えば、硫安塩析法、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー、アフィニティーコロマトグラフィー、電気泳動法等を、単独又は適宜組み合わせることにより行う。

上記方法により得られたIFSは、P450還元酵素及びジラウリルホスファチジルコリン等のリン脂質と共にミセル系を形成後、NADPHと酸素分子の存在下で、フラバノン類を基質として、水酸化反応とアリール転位反応により2-ヒドロキシイソフラバノン類を合成することができる。また、形質転換体が真核細胞である場合、形質転換後、培養して得られた細胞を破碎し、遠心分離を行うことにより得られるミクロソームは、同様の反応により2-ヒドロキシイソフラバノン類を合成することができる。本発明は、本発明の酵素の反応により得られる化合物またはその誘導体の製造のための本発明のポリヌクレオチドの使用にも関する。かかる化合物またはその誘導体としては、例えばダイゼイン、ゲニステ

イン、6, 7, 4' -トリヒドロキシイソフラボン、7, 8, 4' -トリヒドロキシイソフラボン、フルモノネチン、2' -ヒドロキシフルモノネチン、メディカルピン等が挙げられる。

## 【0027】

## 3. トランスジェニック植物

本発明のIFS活性ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを、適当なプロモーター、ターミネータ等、植物細胞で発現可能な転写制御領域と共に植物細胞に導入することにより、IFS活性ポリペプチド、IFS活性ポリペプチドが触媒する酵素反応の生成物またはその誘導体を生産するように形質転換されたトランスジェニック植物を得ることができる。これにより、本来はIFSを発現しない種の植物において、IFSを発現させ、さらにこれにより触媒される反応の反応生成物である2-ヒドロキシイソフラボン類、ひいてはその誘導体であるイソフラボン類を生産させることが可能になる。イソフラボン類としては、上記で例示したものが挙げられる。従って、本発明はこれらの物質を生産する植物を得るためのポリヌクレオチドの使用にも関する。この方法は、本来イソフラボン類を含まない植物にイソフラボン類を発現させ、耐病性を高めたり、イソフラボン類を多く含む食品として提供される植物を提供するのに有用である。

## 【0028】

植物細胞で発現可能な転写制御領域としては、前述したような、植物全体で発現するCaMV 35S RNAプロモーター、CaMV 19S RNA プロモーター、ノバリン合成酵素プロモーター等、緑色組織で発現する Rubisco 小サブユニットプロモーター等、種子などの部位特異的に発現するナピン(napin)、ファセオリン(phaseolin)等の遺伝子のプロモーター領域等が挙げられる。また、3'末端に、ノバリン合成酵素ターミネーター、Rubisco 小サブユニット3'側部位等のターミネーターが連結されてもよい。

また、プロモーター領域に、エンハンサーを導入することにより、発現の増加をもたらすことができる。エンハンサーとしては、35Sプロモーターに見出されるようなウイルスのエンハンサー(Odel1等、Plant Mol. Bi

○1. (1988) 10:263-272)、オピン遺伝子からのエンハンサー(Fr omm等、Plant Cell (1989) 1:977-984)が挙げられ、本発明のポリヌクレオチドに作動できるように連結されたプロモーターに配置すると増加した転写をもたらす、あらゆる他の種類のエンハンサーが含まれる。

これにより、イソフラボン類の含有量の高いトランスジェニック植物を得ることができる。イソフラボン類としては、上記で例示したものが挙げられる。従って、本発明は、イソフラボン類の生産量の増大した植物を提供するための本発明のポリヌクレオチドの使用にも関する。そのような方法は、例えば耐病性の高められた植物、イソフラボン類を多く含む食品として提供されるための植物の提供に有用である。

#### 【0029】

さらに、本発明においては、アンチセンス阻害により植物におけるIFSの発現を抑制することができる。即ち、本発明のポリペプチドのアンチセンスRNAを、プロモーター等の発現調節配列と共に含むベクターを植物細胞に導入することにより、IFSの発現を阻害することもできる。これにより、イソフラボン類を含まないか、低下した量で含有するトランスジェニック植物を得ることができる。イソフラボン類としては、上記で例示したものが挙げられる。

従って、本発明はこれらの物質の生産が抑制された植物を得るためのポリヌクレオチドの使用にも関する。この方法は、例えば家畜の不妊化を起こさせない飼料の提供に有用である。

#### 【0030】

トランスジェニック植物は、当該分野において広く知られている方法、例えば、アグロバクテリウム法、パーティクルガン法、エレクトロポレーション法、PEG法等により得ることができ、宿主細胞に適する方法が選択される。

アグロバクテリウム法としては、例えばバイナリーベクターを用いる方法がある。これは、Tiプラスミド由来のT-DNA、大腸菌などの微生物で機能可能な複製起点、及びベクターを保持する植物細胞または微生物細胞を選択するためのマーカー遺伝子を含むベクターを植物に感染させ、この植物から採取した種子

を生育させ、マーカー遺伝子の発現を指標としてベクターが導入された植物を選択する方法である。得られた植物について、IFS活性を測定するか、IFSにより触媒される反応の生成物またはその誘導体としてのイソフラボン類等の含量が変化したものを選択することによって、目的とする形質転換植物を取得することができる (Plant Physiol., 91, 1212 (1989)、WO94/02620, Plant Mol. Biol., 9, 135 (1987)、Bio/Technology, 6, 915 (1988))。

また、パーティクルガン法は、例えば下記の文献に記載されている方法により行われる。Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 145 (1989)、TIBTECH, 8, 145 (1990)、Bio/Technology, 6, 923 (1988)、Plant Physiol., 87, 671 (1988)、Develop. Genetics, 11, 289 (1990)、Plant cell Tissue & Organ Culture, 33, 227 (1993)。

エレクトロポレーション法は、例えば下記の文献に記載された方法により行うことができる。Plant Physiol., 99, 81 (1992)、Plant Physiol., 84, 856 (1989)、Plant Cell Reports, 10, 97 (1991)。

### 【0031】

#### 【実施例】

本発明は、以下の実施例においてさらに説明される。別に記載しない限り、全ての割合及びパーセンテージは重量によるものである。これらの実施例は、例示であって、本発明を限定するものではない。当該技術分野の技術者は、本発明の記載及び当該分野で知られている情報により様々な改良及び修正を行い得る。

### 【0032】

#### 1. 植物材料及び培養方法

*Glycyrrhiza echinata* (以下、カンゾウと記す) の葉及び葉柄からカルス培養物を形成した。 $\alpha$ -ナフタレン酢酸 (1mg/1) 及びN-6-ベンジルアデニン (1mg/1) を含有する1/2濃度のMurashige

e-Skooog's 培地 (0.3% (w/v) ゲランガムで固化) 中、12時間光照射して (6,000ルクス) 、12時間暗所にて培養した。この培養物を、2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 (0.1mg/1) 及びカイネチン (1mg/1) を添加したMS培地に懸濁し、培養した。この培養液に対して、0.2% (w/v) の酵母抽出物 (YE, Difco社製) を添加することによりエリシタ一処理を行った。その後、培養細胞を減圧濾過により集め、すぐに液体窒素で凍結し、-80°Cで保存した。

### 【0033】

#### 2. cDNAライブラリー及びスクリーニング

上記エリシタ一処理から6時間後及び12時間後の上記カンゾウの培養細胞から、Straight A's mRNA isolation system (Novagen社製) を用いて、ポリ(A) を有するRNAを単離した。これらのポリ(A) を有するRNA (各25μg) を混合し、ZAP-cDNA合成キット (Stratagene社製) を用いて、これに対するcDNAを合成し、cDNAライブラリーを作製した。このcDNAライブラリーのブラーク ( $2 \times 10^5$ ) をハイボンド-N+膜 (Amersham社製) に転写し、ECLダイレクト核酸標識システム (Amersham社製) を用いて、セイヨウワサビペルオキシダーゼ (以下、HRPと記す) で標識した配列番号：3の配列を有するポリヌクレオチドをプローブとしてスクリーニングした。このポリヌクレオチドは、上記と同様のエリシタ一処理から8時間後のカンゾウの培養細胞から、プライマーとして5'-(T/C/A) T I (C/G) C I T T (T/C) (G/A) G I I I I G G I (A/C) (G/C) I (A/C) G-3' (Iはイノシンである) (配列番号：8) 及び5' - A A T A C G A C T C A C T A T A G -3' (配列番号：9) の合成ポリヌクレオチドを用いたPCR (95°Cで3分、その後95°Cで1分間、45°Cで1分間、72°Cで2分間を30サイクル、最後に72°Cで10分間) により増幅して得られる断片の一つである。ハイブリダイゼーションは、500mMのNaCl及び5% (w/v) のブロッキング試薬を含有するECLハイブリダイゼーションバッファーを用い、42°Cで6時間行った。膜の洗浄を、0.4% SDSを含有する55°Cの1×SSCで10分間×

2回、及び室温の2×SSCで10分間を2回で行った。HRP標識ハイブリッド複合体を検出するために、ECL検出試薬(Amersham社製)を膜に添加した。この膜をKodak XAR-5フィルムに1分間暴露した。可能性のあるクローニングを製造者のプロトコルによる *in vivo excision* により pBlue script SK (-) ファージミドに挿入した。挿入したDNAの長さを、T3 (5' - ATTAACCTCACTAAAG - 3') (配列番号: 10) 及びT7 (5' - AATACGACTCACTATAG - 3') (配列番号: 9) プライマーを用いてのPCRにより調べ、約2000塩基の長さを有する完全長のヌクレオチド配列を有するクローニングを得た。このうちの一つが、配列番号: 1 の配列を有するcDNAであり、以下の実験によりIFSであることが確認された(以下、この完全長のcDNAを CYP Ge-8と記す)。

## 【0034】

## 3. 発現ベクターの構築、酵母細胞での発現及びミクロソームでの製造

CYP Ge-8のコード領域を、KODポリメラーゼおよび鋳型として CYP GE-8 cDNAクローニングを用い、センスプライマーとして下記のプライマー: Ge-8 S1 (配列番号: 4)、アンチセンスプライマーとして下記のプライマー: Ge-8 A1 (配列番号: 5) を用いたPCRにより増幅した。

Ge-8 S1: 5' - AACACAGGTACCATGTTGGTGGAAC  
TTGC - 3'

Ge-8 A1: 5' - CGCGCGAATTCTTACGACGAAAA  
GAGTT - 3'

センスプライマーは開始コドン(ATG)の上流にKpn I認識部位(GGT ACC)を有し、アンチセンスプライマーは終止コドン(TAA)の下流にEco RI認識部位(GAATTTC)を有する。PCR生成物をKpn IおよびEco RIで処理して得られた断片を、URA3選択マーカーを有するpYES2発現ベクター(Invitrogen社製)の同じ制限酵素認識部位にクローニングした。このようにして得られたプラスミド pYES Ge-8 でプロテアーゼ欠損酵母(Saccharomyces cerevisiae) BJ216

8株(a; prc1-407, prb1-1122, pep4-3, leu2, trp1, ura3-52:ニッポンジーン社製)を酢酸リチウム法により形質転換した。形質転換体は、yeast nitrogen base with out amino acids(Difco社製)6.7mg/ml、グルコース20mg/ml、ロイシン30μg/ml、トリプトファン20μg/ml、及びカザミノ酸5mg/mlを含有する培地で選択した。

## 【0035】

P450タンパク質の誘導のために形質転換酵母を上記培地(25ml)で10時間液体培養し、細胞を遠心分離(3,000×g)で回収した。細胞をグルコースを含まない40倍量(1000ml)のYPGE培地(10g/1酵母抽出物(Difco社製)、10g/1バクトペプトン(Difco社製)、20g/1ガラクトース、3%(w/v)エタノール、2mg/1ヘミンを含有する)に移し、24時間から36時間培養した。集菌して得られた酵母細胞を、10%のスクロース及び14mMの2-メルカプトエタノールを含有する0.1Mリン酸カリウム(pH7.5)にガラスビーズ(0.35~0.6mm径)と共に懸濁し、ボルテックスミキサーで10分間細胞を激しく攪拌して破壊した。これを、10,000×g及び15,000×gで各々10分間遠心分離し、得られた上清を160,000×g90分間の超遠心にかけミクロソームを製造した。pYES2で形質転換した酵母細胞を対照として使用した。

## 【0036】

## 4. 酵素アッセー

## a) 基質の調製

酵素アッセーの放射性標識基質として(2S)-[<sup>14</sup>C]リキリチゲニン(7,4'-ジヒドロキシフラバノン)及び(2S)-[<sup>14</sup>C]ナリンゲニン(5,7,4'-トリヒドロキシフラバノン)を合成した。[<sup>14</sup>C]マロニルCoA及び4-クマロイルCoAを、エリシター処理後12時間のカンゾウ培養細胞の細胞フリー抽出液及びNADPHと30℃で3時間インキュベートすることにより、(2S)-[<sup>14</sup>C]リキリチゲニン(7,4'-ジヒドロキシフラバン)を製造した。

また、NADPHを添加しない以外は上記と同様の方法により(2S)-[<sup>14</sup>C]ナリンゲニン(5, 7, 4'-トリヒドロキシフラバノン)を合成した。

これにより得られた(2S)-[<sup>14</sup>C]リキリチゲニン(以下標識リキリチゲニンと記す)及び(2S)-[<sup>14</sup>C]ナリンゲニン(以下、標識ナリンゲニンと記す)をTLCにより精製した。(各々6.4 kBq/nmol, 0.08 nmol)

#### 【0037】

##### b) 標識リキリチゲニンとの反応

上記の精製した標識リキリチゲニンを2-メトキシエタノール30μl中に溶解し、1mlの上記酵母ミクロソームに加え、1mMのNADPHの存在下、30℃で2時間インキュベートした。

30μlの酢酸で反応を終結させた後、混合物中の酢酸エチル抽出物を、TLCラジオクロマトスキャナーで分析した。TLCはセルロース(フナコシ(株)製フナセルSF)を用い、15%酢酸で展開した。結果を図2Aに示す。図より、未反応基質(Rf 0.51)の他に、三つの放射活性化合物[P1(Rf 0.74), P2(Rf 0.64), P3(Rf 0.38)]の存在が認められる。Rf値から、P3がイソフラボン、ダイゼイン(7, 4'-ジヒドロキシイソフラボン)である可能性が高いとされた。

反応生成物のイソフラボンへの酸触媒転化のために、濃縮された酢酸エチル抽出物を、メタノール中の10%HCl 1500μlに溶解し、室温で1時間、50℃で10分間攪拌した。得られた反応混合物を酢酸エチルで抽出し、同条件でTLCを行った後、TLCラジオクロマトスキャナーで分析した。結果を図2Bに示す。図に示されるように、P1のRfにおける相対的放射活性が減少し、P3の放射活性が増加した。これにより、P1は容易に脱水してダイゼインを生じさせる2, 7, 4'-トリヒドロキシイソフラバノンである可能性が高い。

#### 【0038】

さらに、放射活性P1を図3Aにオートラジオグラムを示したTLC板から単離して、HClと反応させ、TLCオートラジオグラフィーで分析したところ、図3Bに示すように、純粋な放射活性生成物P3(ダイゼイン)が生じた。

さらに、CYP Ge-8がIFSであることを示すために、1mlの上記ミクロソームに、非標識リキリチゲニン $10\mu g$ を添加し、1mMのNADPHの存在下、30℃で2時間インキュベートした。反応液を酢酸エチルで抽出後、酢酸エチル層をHPLC（カラム、Shim-pack CLC-ODS (6.0 × 150 mm；島津社製)；溶媒、H<sub>2</sub>O中40%メタノール）で分析した。溶出液を285 nmでモニターした。結果を図4 Aに示す。予想通り、ダイゼインのピーク (R<sub>t</sub> 21.0 min) 及び二つの別のピーク (R<sub>t</sub> 5.5, 7.9 min) が見られた。酢酸エチル抽出物を酸で処理すると、図4 Bに示すように、ダイゼインの強いピークが現れた。図4 AのR<sub>t</sub> 5.5 minの生成物はP1であることが、TLC分析により確認された。

#### 【0039】

質量スペクトル分析のために、上記酵母ミクロソームとリキリチゲニンとのインキュベーションをさらに大規模に（上記規模の200倍）行った。反応混合物の酢酸エチル抽出物をKieselgel F<sub>254</sub> (Merck社製) で、溶媒としてトルエン／酢酸エチル／メタノール／石油ベンジン (6:4:1:3) を用いて、分離用TLCを行った。P1 (R<sub>f</sub> 0.2) 及びP3 (R<sub>f</sub> 0.3) のスポットを集め、さらにHPLCで精製し、その質量スペクトルを JEOL JMS-AX505H質量分析計により、電子衝撃 (EI) モードで、イオン化電圧70 eVで記録した。

P1の質量スペクトルを図5に、P3の質量スペクトルを図6に示す。これにより、P1が2, 7, 4'-トリヒドロキシイソフラバノンであり、P3がダイゼインであることが確認された。

#### 【0040】

##### c) 標識ナリンゲニンとの反応

基質として、標識リキリチゲニンの代わりに標識ナリンゲニンを用いること以外は、上記と同じ方法により、酵母ミクロソームとのインキュベーション及びTLC分析を行った。図7 Aに示すように、放射性スポットとしてP4 (R<sub>f</sub> 0.69) 及びP5 (R<sub>f</sub> 0.64) が確認された。その後、P4のスポットを集め、HCl処理したところ、図7 Bに示すように新たなスポットが得られた。この

スポットはゲニステインのサンプルと同じ移動度を示した。従って、P4は2, 5, 7, 4' -テトラヒドロキシイソフラボンであることが確認された。

上記の実験により、CYP Ge-8によりコードされるタンパク質が、リキリチゲニンにもナリンゲニンにも作用し、各々酸処理によりダイゼイン、ゲニステインを生成し得る2, 7, 4' -トリヒドロキシイソフラバノン及び2, 5, 7, 4' -テトラヒドロキシイソフラバノンを生成すること、即ちIFSであることが証明された。なお、上記実施例においては、HCl処理により脱水反応を行っているが、カンゾウの細胞においては、デヒドラターゼの作用により脱水反応が進むと考えられる。

#### 【0041】

##### 5. P450抗血清及びイムノプロット分析

植物シトクロムP450のアミノ酸配列についての共通配列を調べ、銳意研究の後、抗原として、下記の二つのオリゴペプチド配列 (Leu Pro Phe Gly Ser Gly Arg Arg Ser Cys (配列番号: 6) 及びTyr Leu Gln Ala Ile Val Lys Glu Thr Leu Arg Leu (配列番号: 7)) を設計した。これらの配列を各々ベースとして、化学的に合成されたN-アセチル化アミノ末端を持つ多抗原性ペプチドを、二羽のウサギに皮下注射した。血中の抗ペプチド抗体力をELISAにより調べたところ、P450酵素に対する抗体が産生されていることがわかった。このP450抗血清を用いてイムノプロッティングを行った。

まず、上記酵母のミクロソームをSDS/PAGEで分離し、ハイポンド-C膜 (Amersham社製) に転写し (約10 μgタンパク質) 、P450抗血清の1:2000希釈液と、室温で1時間インキュベートした。免疫反応性のタンパク質を、製造者のプロトコルに従い ECL Western blotting analysis system (Amersham社製) で検出した。

#### 【0042】

図8Aに示すように、SDS/PAGEにおいて、分子量約59kDaの新しいバンドが検出された。これはアミノ酸配列に基づいて計算された分子量59,

428Daと合致する。

図8Bに示すように、CYPGe-8を発現していると予測される細胞のミクロソームを用いたイムノプロットでは、同じく59kDaに顕著なシグナルが示された。

#### 【0043】

#### 6. ノーザンプロット分析

「1. 植物材料及び培養方法」の欄で記載したのと同じ培養条件で培養したカンゾウの懸濁培養細胞を、エリシター処理の後、3, 6, 12, 24, 48時間に収穫した。mRNAをStraight A's mRNA isolation system (Novagen社製) を用いて抽出した。ノーザンプロット分析のために、mRNA (900ng) を1%アガロース-ホルムアルデヒドゲルで電気泳動し、ハイボンド-N+膜 (Amersham社製) に転写した。電気泳動後のゲルを臭化エチジウムで染色することにより、RNA量を確認した。CYP Ge-8のコード領域を前記のGe-8S1, Ge-8A1プライマーを用いてPCRで増幅した。これを化学発光用のAlkPhos Direct system (Amersham社製) を用いてアルカリホスファターゼ標識し、ハイブリダイゼーション用のプローブとした。プロットを500mMのNaCl及び4%のブロック試薬を含むハイブリダイゼーションバッファー中で、55°Cで12時間、プローブとハイブリダイズさせた。製造者のプロトコルに従い、膜を一次洗浄バッファーにより55°Cで10分間2回洗浄し、膜を二次洗浄バッファーにより室温で5分間2回洗浄した。

図9に示すように、エリシター処理後、3~6時間経過時の細胞におけるmRNAの蓄積が多いことがわかる。

#### 【0044】

#### 【発明の効果】

本発明により、2-ヒドロキシイソフラボンシンターゼをコードするヌクレオチド配列を実質的に含むポリヌクレオチドが提供される。このポリヌクレオチドを用いて、IFSを発現する形質転換体を得ることができる。これは、イソフラボン類の生産、イソフラボン類に富む食品材料の提供、植物の耐病性の強化等

の点で有用である。

【0045】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

〈110〉 Nihon university

〈120〉 Polynucleotide coding 2-hydroxyisoflavanone synthase

〈130〉 PA99001

〈160〉 10

〈210〉 1

〈211〉 1895

〈212〉 DNA

〈213〉 Glycyrrhiza echinata

〈220〉

〈221〉 CDS

〈222〉 (144)..(1712)

〈400〉 1

cacaaaatcct aattgccctc aactcataaa tcttcagg tactggactc ttgttcgt 60

acttcctcct atactcgact ctttgttatt agttatcatt attattatta caccattaaa 120

gtagcaaaga tcaaacaaac acc atg ttg gtg gaa ctt gca att act ctg ttg 173

Met Leu Val Glu Leu Ala Ile Thr Leu Leu

1

5

10

gtg ata gcc ctg ttc ata cac ctg cgt ccc aca cta agt gca aaa tca 221

Val Ile Ala Leu Phe Ile His Leu Arg Pro Thr Leu Ser Ala Lys Ser

15

20

25

aag tcc ctt cgc cac ctc cca aac cct cca agt cca aaa ccc cgt ctc 269

Lys Ser Leu Arg His Leu Pro Asn Pro Pro Ser Pro Pro Lys Pro Arg Leu  
 30 35 40

cca ttt gtg ggt cac ctt cac ctt tta gac aaa ccc ctt ctc cac tac 317  
 Pro Phe Val Gly His Leu His Leu Asp Lys Pro Leu Leu His Tyr  
 45 50 55

tcc ctc atc gac cta agc aaa cgc tat ggt ccg ctt tac tcc ctc tac 365  
 Ser Leu Ile Asp Leu Ser Lys Arg Tyr Gly Pro Leu Tyr Ser Leu Tyr  
 60 65 70

ttc ggt tcc atg cca acc gtt gta gcc tcc acc cct gaa ctt ttc aaa 413  
 Phe Gly Ser Met Pro Thr Val Val Ala Ser Thr Pro Glu Leu Phe Lys  
 75 80 85 90

ctc ttc ctc caa act cac gag gcc tct tcc ttc aac aca agg ttc caa 461  
 Leu Phe Leu Gln Thr His Glu Ala Ser Ser Phe Asn Thr Arg Phe Gln  
 95 100 105

acc tct gcc att agg cgc cta acc tac gac aac tct gtt gcc atg gtt 509  
 Thr Ser Ala Ile Arg Arg Leu Thr Tyr Asp Asn Ser Val Ala Met Val  
 110 115 120

ccc ttt ggt cct tac tgg aag ttc att agg aag ctc atc atg aac gac 557  
 Pro Phe Gly Pro Tyr Trp Lys Phe Ile Arg Lys Leu Ile Met Asn Asp  
 125 130 135

ctc ctc aat gcc aca act gtg aac aag ttg agg cct tta agg agc caa 605  
 Leu Leu Asn Ala Thr Thr Val Asn Lys Leu Arg Pro Leu Arg Ser Gln

140	145	150	
gaa atc cga aag gtc ctc agg gtg atg gca cag agt gct gag tct cag			653
Glu Ile Arg Lys Val Leu Arg Val Met Ala Gln Ser Ala Glu Ser Gln			
155	160	165	170
gtc cca ctt aat gtc acc gag gag ctt ctc aag tgg acc aac agc acc			701
Val Pro Leu Asn Val Thr Glu Glu Leu Leu Lys Trp Thr Asn Ser Thr			
175	180	185	
atc tcg agg atg atg ctt ggg gaa gca gag gaa atc agg gac ata gca			749
Ile Ser Arg Met Met Leu Gly Glu Ala Glu Glu Ile Arg Asp Ile Ala			
190	195	200	
cgt gac gtg ctt aag atc ttt ggg gag tat agt ctc acc gac ttc atc			797
Arg Asp Val Leu Lys Ile Phe Gly Glu Tyr Ser Leu Thr Asp Phe Ile			
205	210	215	
tgg ccc ttg aag aaa ctc aag gtt ggg caa tac gag aag agg att gac			845
Trp Pro Leu Lys Lys Leu Lys Val Gly Gln Tyr Glu Lys Arg Ile Asp			
220	225	230	
gat ata ttc aac agg ttt gac ccc gtc att gag agg gtc atc aag aaa			893
Asp Ile Phe Asn Arg Phe Asp Pro Val Ile Glu Arg Val Ile Lys Lys			
235	240	245	250
aga cag gag att agg aag aag agg aag gag agg aat ggt gag atc gag			941
Arg Gln Glu Ile Arg Lys Lys Arg Lys Glu Arg Asn Gly Glu Ile Glu			
255	260	265	

gag ggt gaa cag agt gtg gtt ttt ctc gac act ttg ctc gat ttt gct 989  
 Glu Gly Glu Gln Ser Val Val Phe Leu Asp Thr Leu Leu Asp Phe Ala  
 270 275 280

gag gac gag acc atg gag atc aaa atc acc aag gaa caa atc aag ggc 1037  
 Glu Asp Glu Thr Met Glu Ile Lys Ile Thr Lys Glu Gln Ile Lys Gly  
 285 290 295

ctt gtt gtg gat ttc ttc tca gca ggg acg gat tcc acg gcg gtg gca 1085  
 Leu Val Val Asp Phe Phe Ser Ala Gly Thr Asp Ser Thr Ala Val Ala  
 300 305 310

aca gac tgg gct ctg tca gag ctc atc aac aac ccc agg gtg ttt caa 1133  
 Thr Asp Trp Ala Leu Ser Glu Leu Ile Asn Asn Pro Arg Val Phe Gln  
 315 320 325 330

aag gca cga gag gag atc gat gcc gtc gtg gga aaa gac aga ctc gtt 1181  
 Lys Ala Arg Glu Glu Ile Asp Ala Val Val Gly Lys Asp Arg Leu Val  
 335 340 345

gac gag gca gat gtc cag aac ctt cct tac att aga tcc atc gtg aag 1229  
 Asp Glu Ala Asp Val Gln Asn Leu Pro Tyr Ile Arg Ser Ile Val Lys  
 350 355 360

gag acg ttc cgc atg cac cca cca cta ccc gtg gtc aaa aga aag tgc 1277  
 Glu Thr Phe Arg Met His Pro Pro Leu Pro Val Val Lys Arg Lys Cys  
 365 370 375

gtg cag gag tgt gag gtc gac ggt tat gtg atc cca gag gga gca ttg			1325
Val Gln Glu Cys Glu Val Asp Gly Tyr Val Ile Pro Glu Gly Ala Leu			
380	385	390	
atc ctt ttc aat gtt tgg gcc gtc gga aga gac cca aaa tac tgg gac			1373
Ile Leu Phe Asn Val Trp Ala Val Gly Arg Asp Pro Lys Tyr Trp Asp			
395	400	405	410
agg ccc act gag ttc cgt ccc gaa agg ttc tta gaa aat gtg ggt gaa			1421
Arg Pro Thr Glu Phe Arg Pro Glu Arg Phe Leu Glu Asn Val Gly Glu			
415	420	425	
ggg gat caa gcc gtt gac ctt agg ggt caa cat ttc caa ctt ctt ccg			1469
Gly Asp Gln Ala Val Asp Leu Arg Gly Gln His Phe Gln Leu Leu Pro			
430	435	440	
ttt ggg tct gga agg agg atg tgc cct ggc gtc aat ttg gcc act gcg			1517
Phe Gly Ser Gly Arg Arg Met Cys Pro Gly Val Asn Leu Ala Thr Ala			
445	450	455	
gga atg gcc aca ctg ctt gcg tca gtt atc cag tgc ttt gat ctc agc			1565
Gly Met Ala Thr Leu Leu Ala Ser Val Ile Gln Cys Phe Asp Leu Ser			
460	465	470	
gta gtg ggc cca cag gga aag ata ttg aag ggc aat gat gcc aag gtt			1613
Val Val Gly Pro Gln Gly Lys Ile Leu Lys Gly Asn Asp Ala Lys Val			
475	480	485	490
agc atg gaa gag aga gct gga ctc acg gtt cca agg gca cat aac ctc			1661

Ser Met Glu Glu Arg Ala Gly Leu Thr Val Pro Arg Ala His Asn Leu  
 495 500 505

atc tgt gtc ccg gtt gca aga tca agt gcc gta ccc aaa ctc ttt tcg 1709  
 Ile Cys Val Pro Val Ala Arg Ser Ser Ala Val Pro Lys Leu Phe Ser  
 510 515 520

tcg taaaacatac gcgcgacacc agaaagctgc catggcatga tgcttttat 1762  
 Ser

ataataattt tcaataaggt atcaatcaat gatatataga caatgataacc catatatcat 1822

cttcgcgact agtctcttt tggtacagta tggtaaca gcttaatct atataatttt 1882

tactcgata tcc 1895

<210> 2

<211> 523

<212> PBT

<213> Glycyrrhiza echinata

<400> 2

Met Leu Val Glu Leu Ala Ile Thr Leu Leu Val Ile Ala Leu Phe Ile  
 1 5 10 15

His Leu Arg Pro Thr Leu Ser Ala Lys Ser Lys Ser Leu Arg His Leu  
 20 25 30

Pro Asn Pro Pro Ser Pro Lys Pro Arg Leu Pro Phe Val Gly His Leu

35 40 45

His Leu Leu Asp Lys Pro Leu Leu His Tyr Ser Leu Ile Asp Leu Ser

50 55 60

Lys Arg Tyr Gly Pro Leu Tyr Ser Leu Tyr Phe Gly Ser Met Pro Thr

65 70 75 80

Val Val Ala Ser Thr Pro Glu Leu Phe Lys Leu Phe Leu Gln Thr His

85 90 95

Glu Ala Ser Ser Phe Asn Thr Arg Phe Gln Thr Ser Ala Ile Arg Arg

100 105 110

Leu Thr Tyr Asp Asn Ser Val Ala Met Val Pro Phe Gly Pro Tyr Trp

115 120 125

Lys Phe Ile Arg Lys Leu Ile Met Asn Asp Leu Leu Asn Ala Thr Thr

130 135 140

Val Asn Lys Leu Arg Pro Leu Arg Ser Gln Glu Ile Arg Lys Val Leu

145 150 155 160

Arg Val Met Ala Gln Ser Ala Glu Ser Gln Val Pro Leu Asn Val Thr

165 170 175

Glu Glu Leu Leu Lys Trp Thr Asn Ser Thr Ile Ser Arg Met Met Leu

特平 1 1 - 0 6 3 7 4 5

180

185

190

Gly Glu Ala Glu Glu Ile Arg Asp Ile Ala Arg Asp Val Leu Lys Ile

195

200

205

Phe Gly Glu Tyr Ser Leu Thr Asp Phe Ile Trp Pro Leu Lys Lys Leu

210

215

220

Lys Val Gly Gln Tyr Glu Lys Arg Ile Asp Asp Ile Phe Asn Arg Phe

225

230

235

240

Asp Pro Val Ile Glu Arg Val Ile Lys Lys Arg Gln Glu Ile Arg Lys

245

250

255

Lys Arg Lys Glu Arg Asn Gly Glu Ile Glu Glu Gly Glu Gln Ser Val

260

265

270

Val Phe Leu Asp Thr Leu Leu Asp Phe Ala Glu Asp Glu Thr Met Glu

275

280

285

Ile Lys Ile Thr Lys Glu Gln Ile Lys Gly Leu Val Val Asp Phe Phe

290

295

300

Ser Ala Gly Thr Asp Ser Thr Ala Val Ala Thr Asp Trp Ala Leu Ser

305

310

315

320

Glu Leu Ile Asn Asn Pro Arg Val Phe Gln Lys Ala Arg Glu Glu Ile

325

330

335

Asp Ala Val Val Gly Lys Asp Arg Leu Val Asp Glu Ala Asp Val Gln  
 340                    345                    350

Asn Leu Pro Tyr Ile Arg Ser Ile Val Lys Glu Thr Phe Arg Met His  
 355                    360                    365

Pro Pro Leu Pro Val Val Lys Arg Lys Cys Val Gln Glu Cys Glu Val  
 370                    375                    380

Asp Gly Tyr Val Ile Pro Glu Gly Ala Leu Ile Leu Phe Asn Val Trp  
 385                    390                    395                    400

Ala Val Gly Arg Asp Pro Lys Tyr Trp Asp Arg Pro Thr Glu Phe Arg  
 —— 405 —— 410 —— 415

Pro Glu Arg Phe Leu Glu Asn Val Gly Glu Gly Asp Gln Ala Val Asp  
 420                    425                    430

Leu Arg Gly Gln His Phe Gln Leu Leu Pro Phe Gly Ser Gly Arg Arg  
 435                    440                    445

Met Cys Pro Gly Val Asn Leu Ala Thr Ala Gly Met Ala Thr Leu Leu  
 450                    455                    460

Ala Ser Val Ile Gln Cys Phe Asp Leu Ser Val Val Gly Pro Gln Gly  
 465                    470                    475                    480

Lys Ile Leu Lys Gly Asn Asp Ala Lys Val Ser Met Glu Glu Arg Ala  
 485                    490                    495

Gly Leu Thr Val Pro Arg Ala His Asn Leu Ile Cys Val Pro Val Ala

500

505

510

Arg Ser Ser Ala Val Pro Lys Leu Phe Ser Ser

515

520

⟨210⟩ 3

⟨211⟩ 422

⟨212⟩ DNA

⟨213⟩ Glycyrrhiza echinata

⟨400⟩ 3

gatgtgcctt ggcgtgaatt tggccactgc gggatggcc acactgcttg cgtcagttat 60  
ccagtgcctt gatctcagcg tagtggccc acaggaaag atattgaagg gcaatgatgc 120  
caaggtagc atggaagaga gagctggact cacggttcca agggcacata acctcatctg 180  
tgtcccggtt gcaagatcaa gtgccgtacc caaactcttt tcgtcgtaaa acatacgcbc 240  
gacaccacag aaagttgcca tggcatgatg cttttatata aataatttc aataaggat 300  
caatcaatga tatatagaca atgataccca tatatcatct tcacgactag tctctcttg 360  
gtacagtatg ttgtaacagc ttaaatctat ataattttt ctcgcataatc catttcctga 420  
tt

422

⟨210⟩ 4

⟨211⟩ 28

⟨212⟩ DNA

⟨213⟩ Glycyrrhiza echinata

⟨400⟩ 4

aaacaggta catgttggtg gaacttgc

28

⟨210⟩ 5

⟨211⟩ 29

⟨212⟩ DNA

⟨213⟩ Artificial Sequence

⟨400⟩ 5

cgcgcgaatt ctttacgacg aaaagagtt 29

⟨210⟩ 6

⟨211⟩ 10

⟨212⟩ PRT

⟨213⟩ Artificial Sequence

⟨400⟩ 6

Leu Pro Phe Gly Ser Gly Arg Arg Ser Cys

1

5

10

⟨210⟩ 7

⟨211⟩ 12

⟨212⟩ PRT

⟨213⟩ Artificial Sequence

⟨400⟩ 7

Tyr Leu Gln Ala Ile Val Lys Glu Thr Leu Arg Leu

特平 1 1 - 0 6 3 7 4 5

1

5

10

⟨210⟩ 8

⟨211⟩ 23

⟨212⟩ DNA

⟨213⟩ Artificial Sequence

⟨400⟩ 8

(t/c/a)ti(c/g)citt(t/c)(g/a) giiiiggi(a/c)(g/c) i(a/c)g

23

⟨210⟩ 9

⟨211⟩ 17

⟨212⟩ DNA

⟨213⟩ Artificial Sequence

⟨400⟩ 9

aatacgactc actatacg

17

⟨210⟩ 10

⟨211⟩ 17

⟨212⟩ DNA

⟨213⟩ Artificial Sequence

⟨400⟩ 10

attnaacccctc actaaag

17

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の2-ヒドロキシイソフラバノンシンターゼが関与する反応を示す反応式である。

【図2】本発明のポリヌクレオチドで形質転換した酵母ミクロゾームの酵素アッセーの結果を示す図である。

【図3】本発明のポリヌクレオチドで形質転換した酵母ミクロゾームの酵素アッセーの結果を示す写真である。

【図4】本発明のポリヌクレオチドで形質転換した酵母ミクロゾームの酵素アッセーの結果を示す図である。

【図5】本発明のポリヌクレオチドで形質転換した酵母ミクロゾームによる反応生成物の質量スペクトル分析の結果を示す図である。

【図6】本発明のポリヌクレオチドで形質転換した酵母ミクロゾームによる反応生成物の質量スペクトル分析の結果を示す図である。

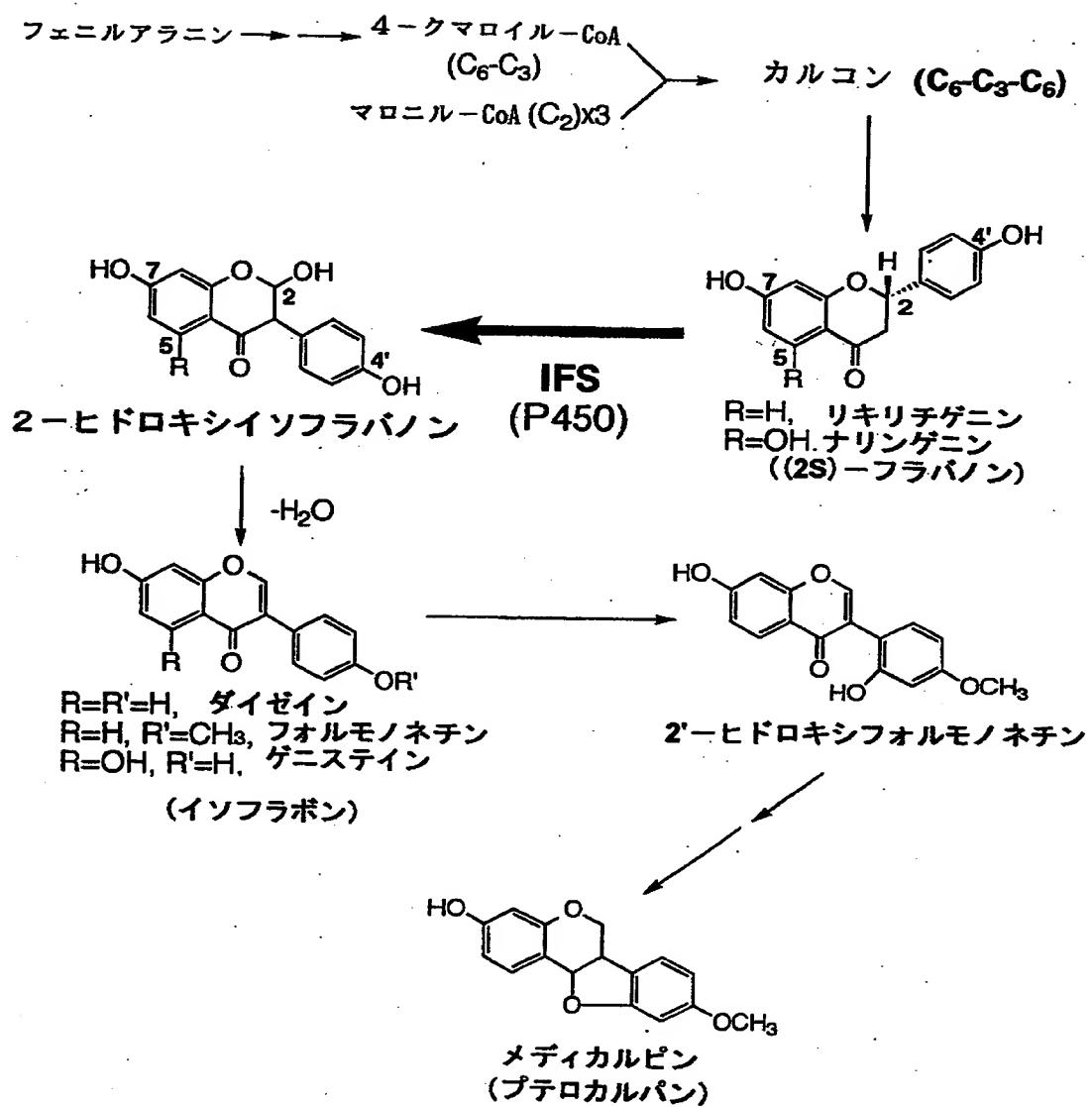
【図7】本発明のポリヌクレオチドで形質転換した酵母ミクロゾームの酵素アッセーの結果を示す写真である。

【図8】本発明のポリヌクレオチドで形質転換した酵母ミクロゾームのS D S / P A G E 及びイムノプロット分析の結果を示す写真である。

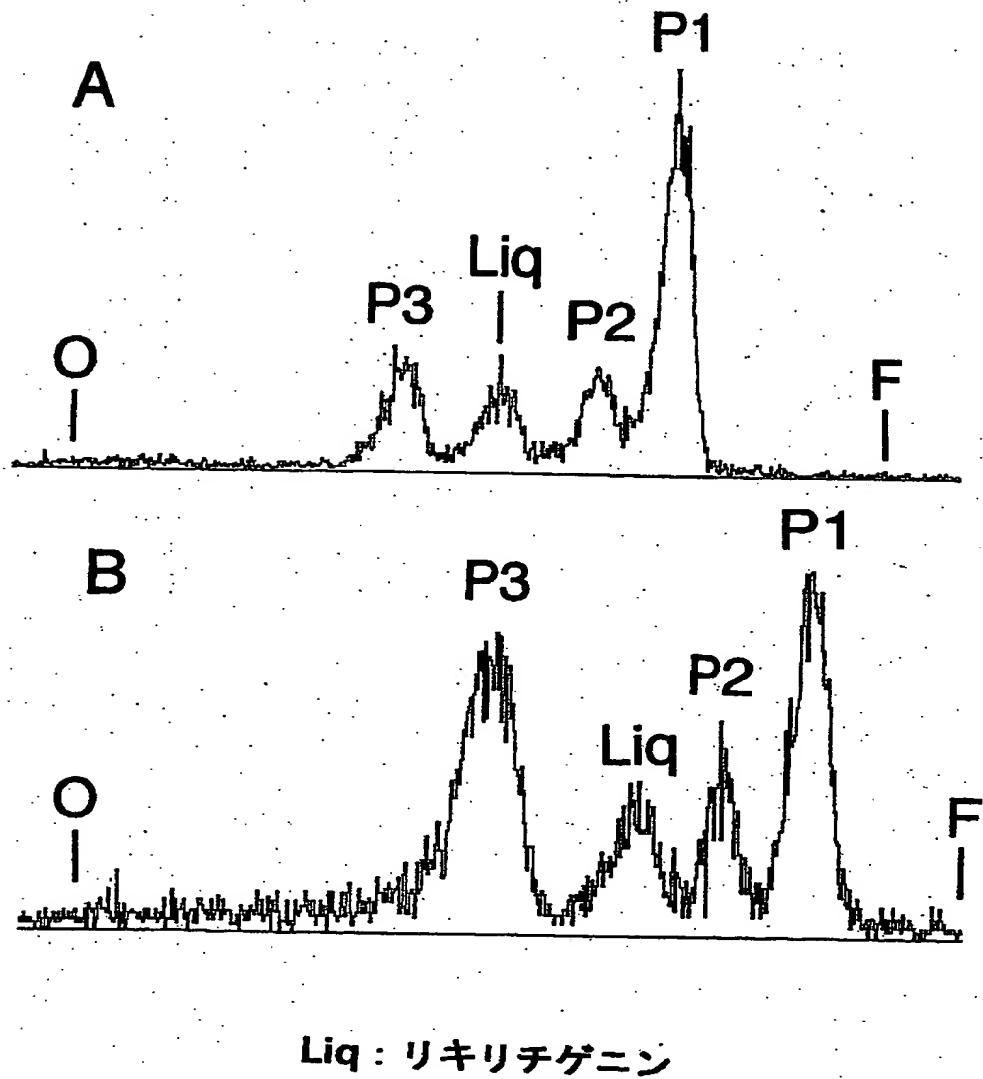
【図9】本発明により得られたm R N A のノーザンプロット分析の結果を示す写真である。

【書類名】 図面

【図1】

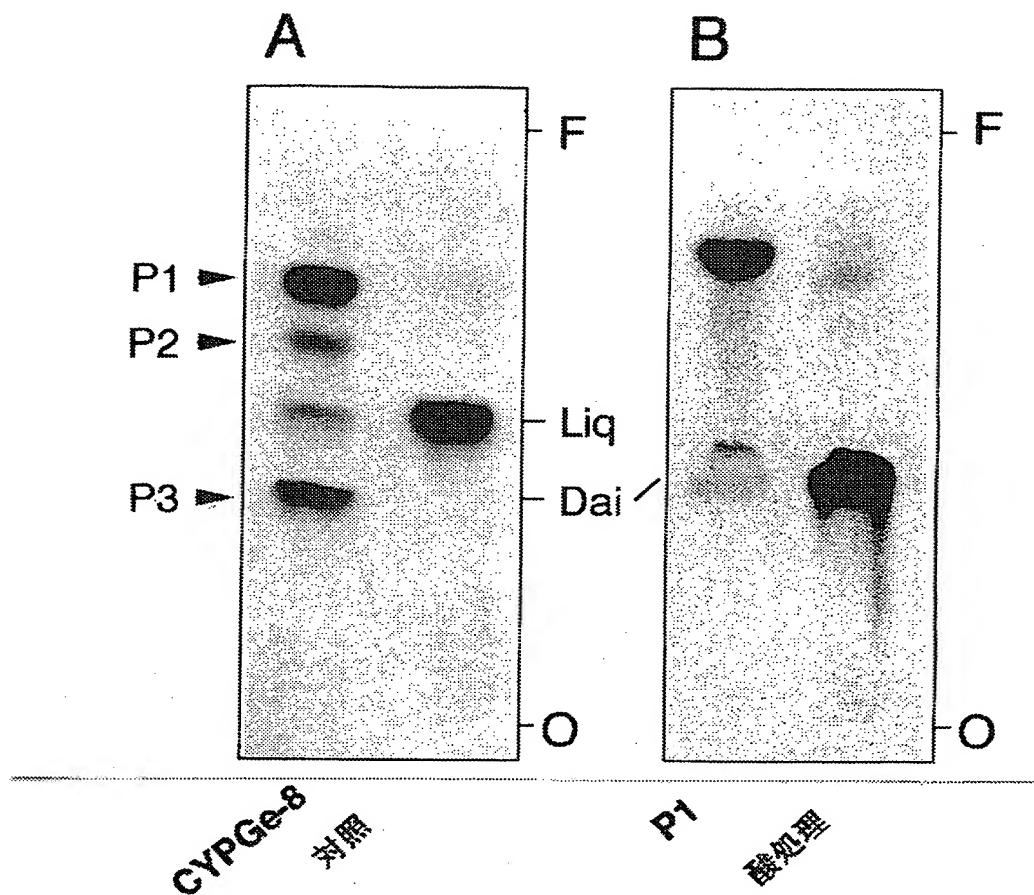


【図2】



【図3】

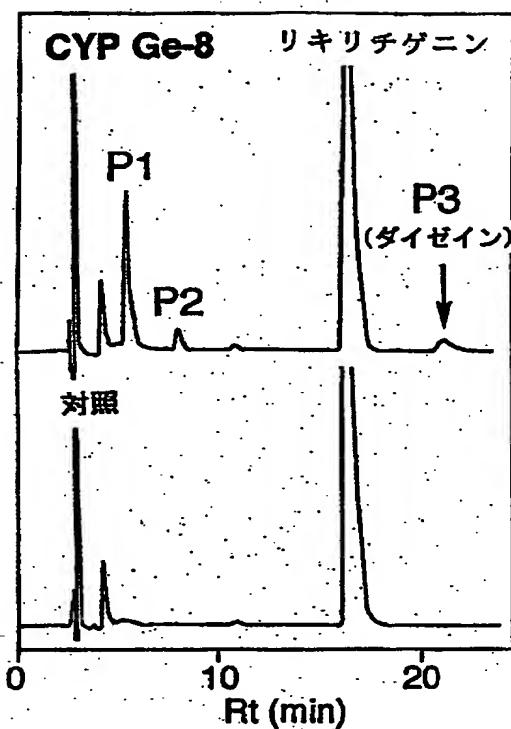
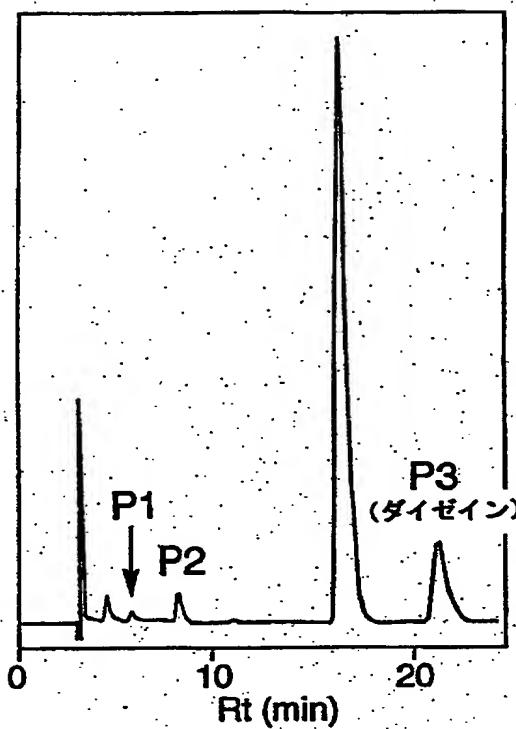
図面代用写真



Liq : リキリチゲニン

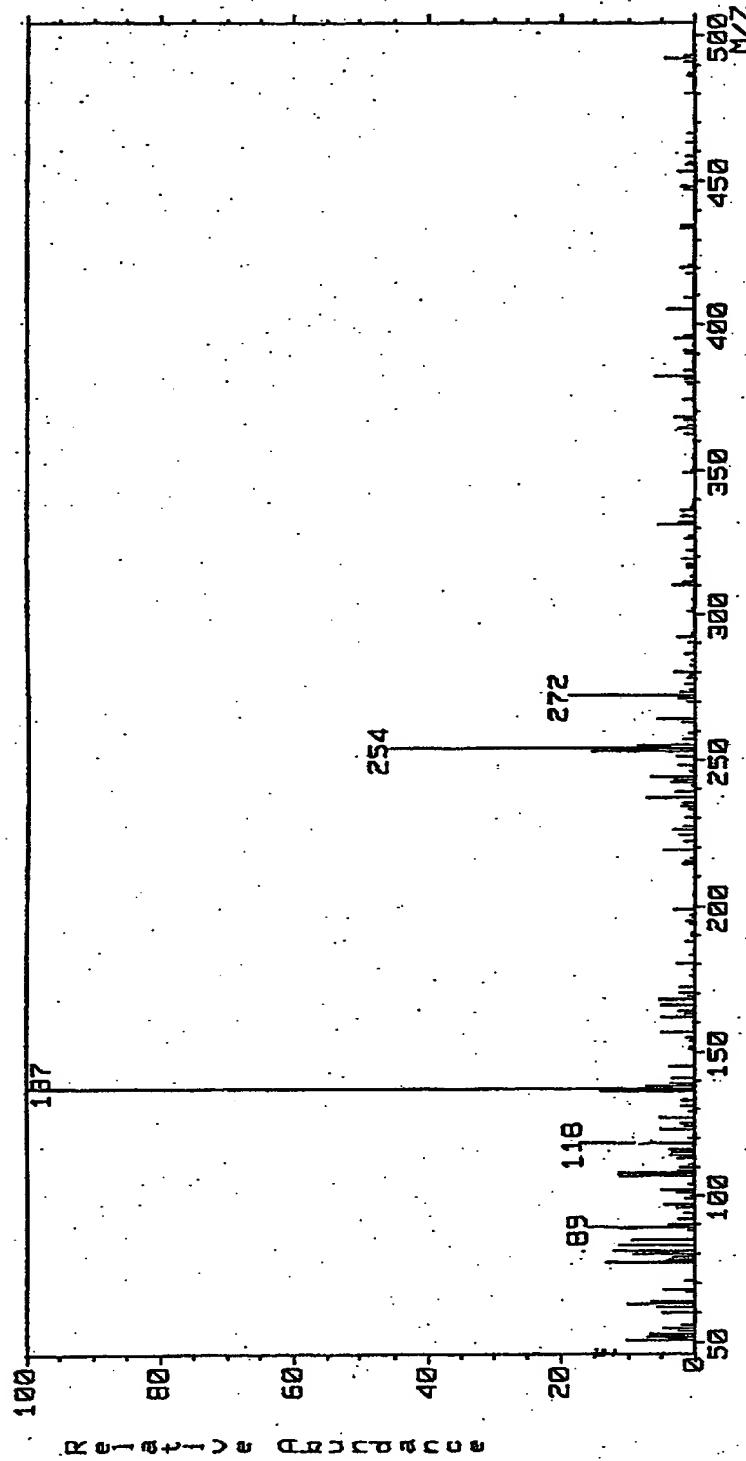
Dai : ダイゼイン

【図4】

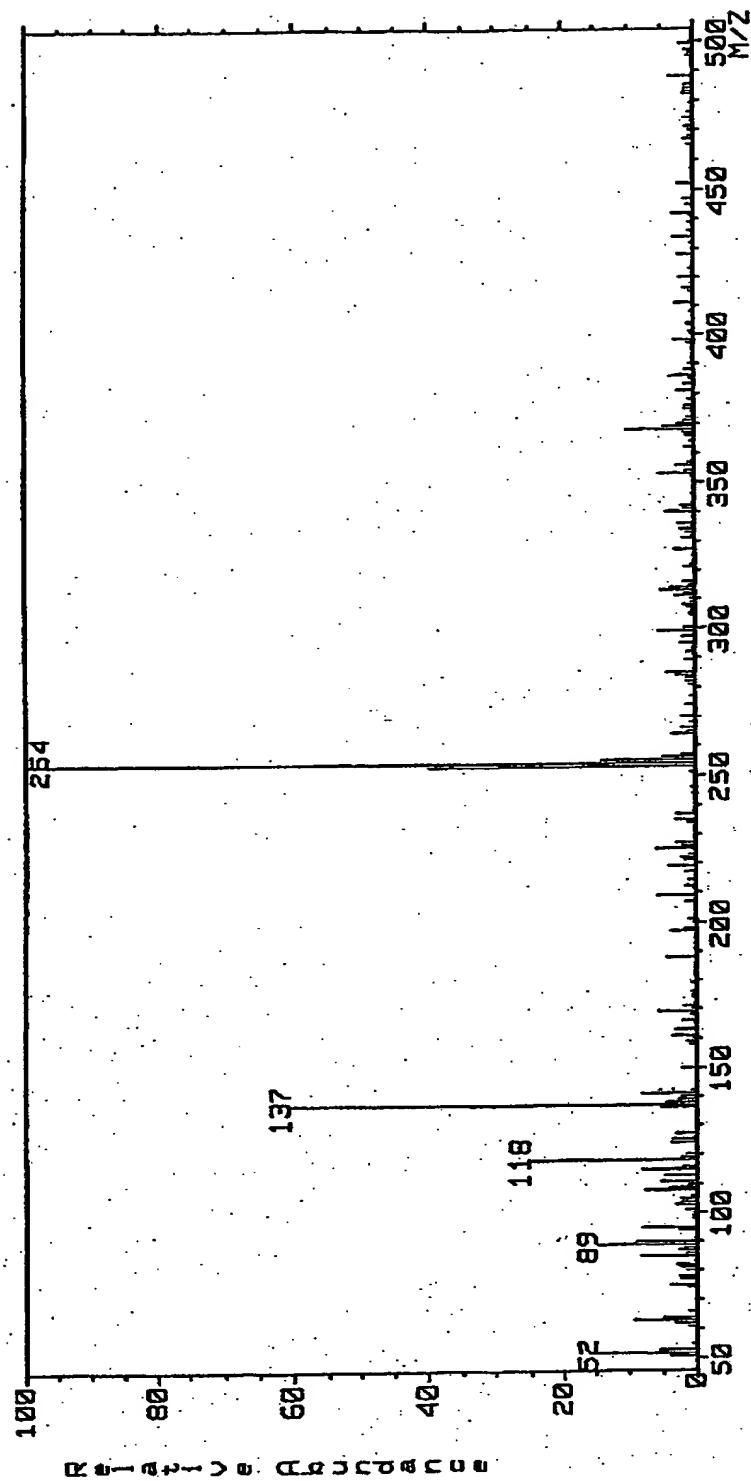
**A****B**

特平11-063745

【図5】

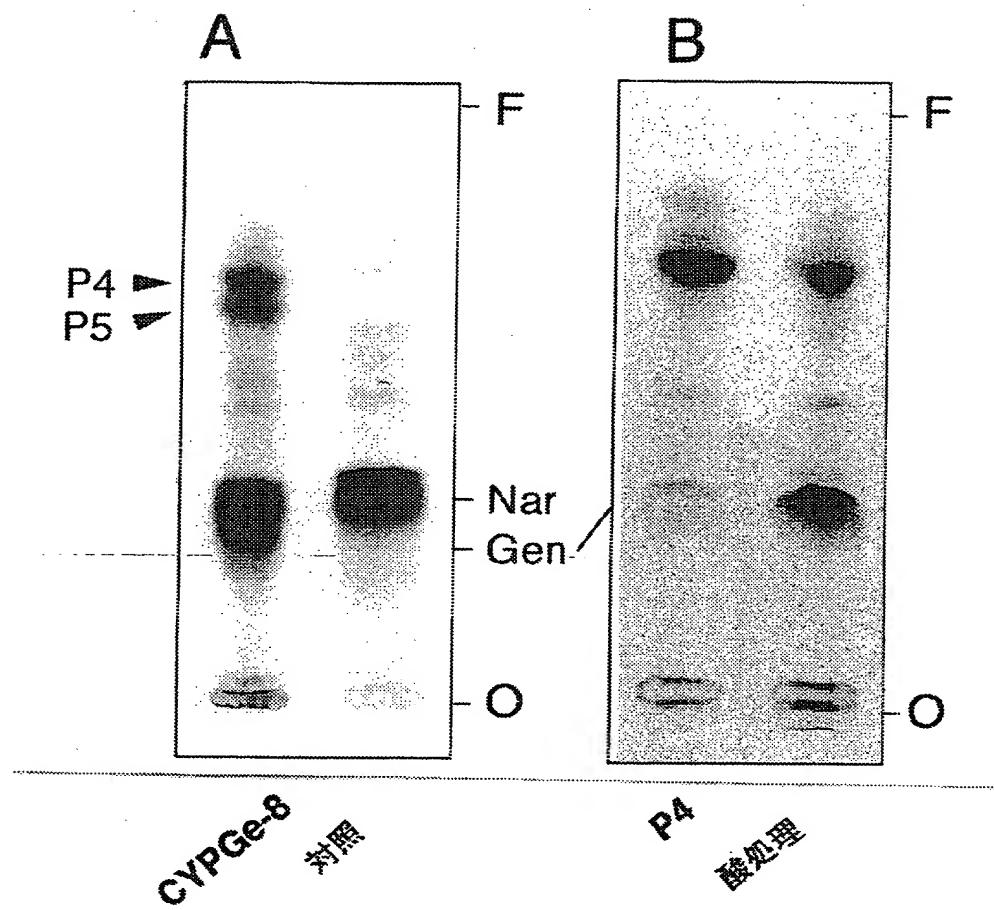


【図6】



【図7】

図面代用写真

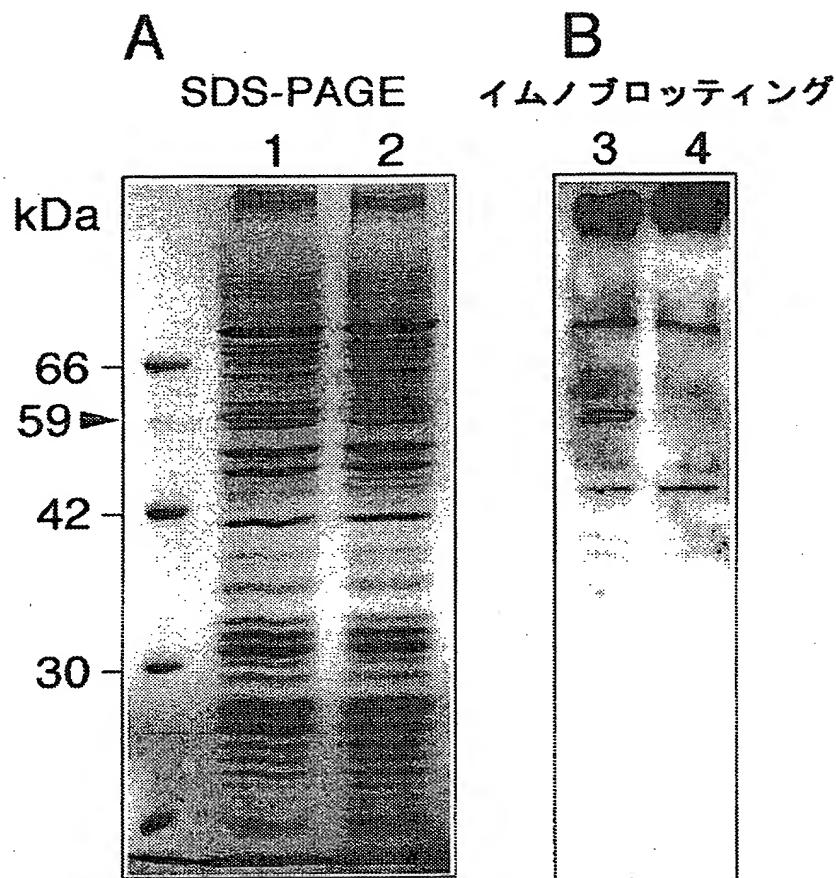


Nar : ナリンゲニン

Gen : ゲニステイン

【図8】

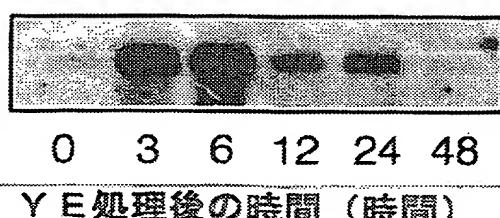
## 図面代用写真



1), 3) CYP Ge-8  
2), 4) pYES2 (対照)

【図9】

## 図面代用写真



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 2-ヒドロキシイソフラバノンシンターゼをコードするヌクレオチド配列を提供する。

【解決手段】 配列番号：1のヌクレオチド配列の情報に基づき、2-ヒドロキシイソフラバノンシンターゼを発現させることができ、また、2-ヒドロキシイソフラバノンシンターゼをコードするポリヌクレオチドを植物細胞に導入することにより、イソフラボン類の生産量の変化した植物を得ることができる。

【選択図】 なし



書式 7

19902300083



## 受 託 証

通知番号：11生寄文第162号

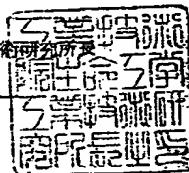
通知年月日：平成11年2月1日

学校法人 日本大学  
理事長 森田 賢治

殿

工業技術院生命工学科技術研究所

大署 信



## 1. 微生物の表示

(寄託者が付した識別のための表示)

CYP Ge-8

(受託番号)

FERM P-17189

## 2. 科学的性質及び分類学上の位置

1種の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。

## ■ 科学的性質

## ■ 分類学上の位置

## 3. 受領及び受託

当所は、平成11年2月1日に受領した1種の微生物を受託する。

認定・付加情報

特許出願の番号 平成11年 特許願 第063745号  
受付番号 19902300083  
書類名 特許願  
担当官 市川 勉 7644  
作成日 平成11年 5月29日

<認定情報・付加情報>

【提出日】 平成11年 2月 4日  
【特許出願人】  
【識別番号】 593116962  
【住所又は居所】 東京都千代田区九段南4丁目8番24号  
【氏名又は名称】 学校法人日本大学  
【代理人】 申請人  
【識別番号】 100101591  
【住所又は居所】 東京都新宿区早稲田鶴巣町519 石垣ビル2階  
実川・川俣特許事務所  
【氏名又は名称】 川俣 静子  
【提出された物件の記事】  
【提出物件名】 微生物の受託証の写し 1

次頁無

出願人履歴情報

識別番号 [593116962]

1. 変更年月日 1993年 5月15日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都千代田区九段南4丁目8番24号

氏 名 学校法人日本大学

*This page blank (reverse)*